

学 位 論 文 題 名

Influence of the mutations of envelope protein amino acids on the biological characteristics of tick-borne encephalitis virus

（ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロップ蛋白のアミノ酸変異が
ウイルスの生物性状に与える影響）

学位論文内容の要旨

ダニ媒介性脳炎（TBE）ウイルスはフラビウイルス科に属し、人に致死率の高い重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因となる。TBE ウイルスはエンベロップ上に2種類の糖蛋白（prM、E）を有し、これらの糖蛋白がウイルスの標的細胞への感染に大きな役割を果たすと考えられている。そのためエンベロップ上の蛋白（特に E 蛋白）の様々な変異がウイルスの生物活性や病原性に影響を与えたという報告は数多い。本研究では TBE ウイルスの prM、E 蛋白の変異が病原性を含めた生物性状に与える影響について解析を加えた。

まず第1章では、培養細胞に適応した TBE ウイルス変異株のマウスにおける病原性解析を行った。TBE ウイルスの Oshima 5-10 株を BHK-21 細胞で継代した所、BHK-21 細胞で増殖が早い変異株（Oshima Cl-1 株）が得られた。Oshima 5-10 株と Oshima Cl-1 株のマウスでの体内動態および両株の遺伝子 RNA 塩基配列と生物性状を比較し、病原性との関連を調べた。その結果、マウス脳内接種による神経毒力は両株間で有意な差は見られなかったが、皮下接種による神経侵入性毒力の比較では Oshima Cl-1 株は Oshima 5-10 株より弱かった。血清中の中和抗体価は両株接種マウス間で有意な差は見られなかったが、Oshima Cl-1 株感染マウスの血液中及び脾臓の平均ウイルス力価はピーク時で Oshima 5-10 株感染マウスよりも減少していた。また、Oshima 5-10 株感染マウスとは異なり、Oshima Cl-1 株感染マウスの脳内ウイルス力価は検出感度以下であった。ウイルス蛋白の推定アミノ酸配列の比較では、E 蛋白と非構造蛋白の一つである NS5 蛋白に1ヶ所ずつアミノ酸の相違が見られた。また、Oshima 5-10 株ではグリコサミノグリカン(GAG)による BHK-21 細胞への感染阻害はほとんど見られなかったが、Oshima Cl-1 株では強い感染阻害が見られた。以上より、Oshima Cl-

1 株は E 蛋白のアミノ酸変異により GAG に対する高い親和性を持つために、細胞外の GAG に捕捉されてウイルスの伝播が起こりにくくなる可能性が考えられた。その結果、中和抗体価が上昇する前の血液中のウイルス量が少なくなるため、脳内へのウイルスの侵入が起こらない事が示唆された。

第 2 章では TBE ウイルスのエンベロープ蛋白の糖鎖付加の変異がウイルス粒子分泌に与える影響について研究を行った。TBE ウイルスの prM 蛋白と E 蛋白には、それぞれ 1箇所ずつ N 型糖鎖結合配列が存在している。また、E 蛋白に結合している N 型糖鎖の数や位置はフラビウイルス科のウイルスの種類によって異なる事が知られている。TBE ウイルスの粒子の分泌と糖蛋白の糖鎖の関連を明らかにするため、哺乳類細胞で TBE ウイルスの prM-E 蛋白を発現するプラスミドを用いたウイルス様粒子(VLPs)分泌発現系を使用して TBE ウイルスの E 蛋白の糖鎖が VLPs の発現量や性状に与える影響を調べた。その結果、prM 蛋白糖鎖欠損型では培養上清中の E 蛋白は野生型と比較して減少が見られた。一方、E 蛋白糖鎖欠損型と prM-E 蛋白糖鎖欠損型では培養上清中の E 蛋白は野生型や prM 蛋白糖鎖欠損型と比較してさらに減少していた。E 蛋白糖鎖増加型では細胞内および培養上清中の E 蛋白が野生型と比較して全体的に増加している事が示された。一方、E 蛋白糖鎖移動型の E 蛋白の合成量は野生型と比較して細胞内では増加していたものの、培養上清中では大幅な減少が見られた。以上より、正常な VLPs の分泌には E 蛋白の糖鎖の付加位置が重要である可能性が示唆された。また、E 蛋白の糖鎖が増加すると E 蛋白の合成分泌が促進される事が示された。

本研究において、TBE ウイルスのエンベロープ蛋白のアミノ酸の様々な変異がウイルスの粒子形成や感染などに影響を及ぼし、ウイルスの弱毒化および生物性状変化の原因となっている事が明らかになった。また、いずれのアミノ酸変異も E 蛋白の抗原性自体を大きく変化させる事はなかったため、今回見出された E 蛋白上のアミノ酸変異は培養細胞で効率良く増殖する弱毒ウイルス株を作出する際に有用な遺伝子マーカーになると考えられる。従って、これらの成績は TBE の新世代ワクチンの開発や新しい診断法の開発に有効に活用できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 堀 内 基 広
副 査 助 教 授 荻 和 宏 明

学 位 論 文 題 名

Influence of the mutations of envelope protein amino acids on the biological characteristics of tick-borne encephalitis virus

(ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロープ蛋白のアミノ酸変異が
ウイルスの生物性状に与える影響)

ダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルスはフラビウイルス科に属し、人に致死率の高い重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因となる。TBE ウイルスはエンベロープ上に2種類の糖蛋白 (prM、E) を有し、これらの糖蛋白がウイルスの標的細胞への感染に大きな役割を果たすと考えられている。本研究では TBE ウイルスの prM、E 蛋白の変異が病原性を含めた生物性状に与える影響について解析を加えた。

TBE ウイルスの Oshima 5-10 株を BHK-21 細胞で継代した所、BHK-21 細胞で増殖が早い変異株 (Oshima Cl-1 株) が得られた。マウス皮下接種による神経侵襲性毒力の比較では Oshima Cl-1 株は Oshima 5-10 株より弱かった。Oshima Cl-1 株感染マウスの血液中及び脾臓の平均ウイルス力価は Oshima 5-10 株感染マウスよりも減少していた。また、ウイルス蛋白の推定アミノ酸配列の比較では、E 蛋白と非構造蛋白の一つである NS5 蛋白に1ヶ所ずつアミノ酸の相違が見られた。また、Oshima Cl-1 株ではグリコサミノグリカン(GAG)による BHK-21 細胞への強い感染阻害が見られた。これらの成績より、Oshima Cl-1 株は E 蛋白のアミノ酸変異により GAG に対する高い親和性を持つために、細胞外の GAG 様物質に捕捉されてウイルスの伝播が起こりにくくなり、神経侵襲性毒力が弱くなった可能性が考えられた。

TBE ウイルスの粒子の分泌と糖蛋白の糖鎖の関連を明らかにするため、哺乳類細胞で TBE ウイルスの prM-E 蛋白を発現するプラスミドを用いたウイルス様粒子 (VLPs) 分泌系を使用して TBE ウイルスの E 蛋白の糖鎖が VLPs の発現量や性状に与える影響を調べた。その結果、E 蛋白糖鎖欠損型と prM-E 蛋白糖鎖欠損型では培養上清中の E 蛋白は野生型と比較して減少していた。この成績より、正常な VLPs の分泌には E 蛋白の糖鎖の付加が重要である可能性が示唆された。

本研究において、TBE ウイルスのエンベロープ蛋白のアミノ酸の様々な変異がウイルスの神経侵襲性毒力の低下および生物性状変化の原因となっている事が明らかになった。よって、審査員一同は上記学位論文提出者後藤明子氏が博士（獣医学）の学位を授与されるのに十分な資格を有するものと認めた。